

オーストラリア産溝牙科ヘビ *Pseudechis australis* のリゾホスホリパーゼ

著者	高崎 親久
号	734
発行年	1983
URL	http://hdl.handle.net/10097/24632

氏名・(本籍)	たか 高	さき 崎	ちか 親	ひさ 久
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理	第	734	号
学位授与年月日	昭和58年5月25日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
最終学歴	昭和45年3月 東北大学大学院理学研究科 (修士課程) 化学第二専攻修了			
学位論文題目	オーストラリア産溝牙科ヘビ <i>Pseudechis australis</i> のリゾホ スホリパーゼ			
論文審査委員	(主査) 教授 田宮 信雄 教授 高瀬 嘉平 教授 小倉 協三			

論文目次

第一章	序 論
第二章	実験材料及び方法
第三章	リゾホスホリパーゼの精製とタンパク化学的性質
第四章	酵素化学的性質
第五章	酵素の化学修飾
第六章	溶 血
第七章	結 語

論文内容要旨

ホスホリパーゼ A₂ はジアシルグリセロリン脂質の 2 位脂肪酸エステルを加水分解する酵素で、ヘビ毒、ハチ毒、哺乳類の臍臓等に見出されている。数多くの研究がなされており多くの共通の性質が明らかにされている。

リゾホスホリパーゼはモノアシルグリセロリン脂質の脂肪酸エステルを加水分解する酵素で従来、ジアシルグリセロリン脂質の 1 位, 2 位双方のエステルを加水分解する酵素, ホスホリパーゼ B と酵素分類上一括して取扱われてきた。

この両者は生物界に広く分布していると考えられるが研究例はあまりない。

ヘビ毒液中の A₂ 以外のホスホリパーゼ活性としては Doery らによるオーストラリア産溝牙科ヘビ *Pseudechis* 属ヘビの毒液のホスホリパーゼ B と Shiloah らによるクサリヘビ科及びコブラ科ヘビ毒液のホスホリパーゼ A₂ が pH10 以上でリゾホスホリパーゼ活性を示すという報告がある。

著者は、オーストラリア産溝牙科ヘビ *Pseudechis australis* 毒液から至適 pH が 7.5 で、ホスホリパーゼ A₂ 活性を持たないリゾホスホリパーゼを単離した。

本論文ではこのリゾホスホリパーゼのタンパク化学的性質及び酵素化学的性質について述べるとともにその溶血作用について考察する。

1) リゾホスホリパーゼの精製とタンパク化学的性質

乾燥毒液から CM-52, Sephadex G-75, DE-52 のカラムクロマトグラフィーにより、リゾホスホリパーゼ I を 50 倍に精製、単離した (表 1)。

蛇毒からリゾホスホリパーゼを単離したのはこれが最初である。

溶血活性は Sephadex G-75 ゲルろ過により大部分消失するが、リゾホスホリパーゼ画分とホスホリパーゼ A₂ 画分を合すると回復する。

本酵素は分子量 14000 のモノマー 2 分子が会合した二量体酵素で分子量の他、1/2 Cys を 14 残基含み、Asp, Lys, Gly, Tyr が多い等のアミノ酸組成上の特徴やアミノ末端部 12 残基のアミノ酸配列は蛇毒ホスホリパーゼ A₂ と類似している。

2) 酵素化学的性質

本酵素はリゾホスファチジルコリンに極めて特異的に作用する。リゾホスファチジルコリン パルミトイルを基質とした時の K_m は 0.153 mM, V_{max} は $58.2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ であり、脂肪酸の飽和、不飽和にはあまり影響されないが、コリンをエタノールアミンに変えると基質との親和力は半減し、 V_{max} は 1/20 に低下する。ホスファチジルコリン、トリパルミチン、モノパルミチン、パラニトロフェニルアセテート等には作用せず、従ってホスホリパーゼ A, B, リパーゼ, カルボキシエステラーゼ作用を持たない。

本酵素の活性測定の際 lag time が観察されたが、反応生成物の一つ、長鎖飽和脂肪酸の添加により lag time を短縮することができた。この際、最大反応速度は変わらなかった。

至適 pH は 7.5, Ca^{2+} が必須で 1 mM EDTA 存在下の至適 Ca^{2+} 濃度は 2 mM である。 Ca^{2+} 以外の 2 価金属イオンでは Mn^{2+} , Mg^{2+} で弱い酵素活性が見られるが, Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} では活性を示さない。

熱安定性は pH 5 ～ 6 では沸騰水中 20 分間の熱処理に耐えるが, pH 3 及び pH 7 以上ではやや不安定となる。6 M 塩酸—グアニジン処理でモノマーに解離するが, 透析により容易に活性な二量体に戻る。すなわち本酵素は熱処理及び変性剤に強い抵抗性を示す。界面活性剤により酵素活性は阻害されるがこれは基質の状態変化によるものとみられ, リゾホスホリパーゼ一般に認められる現象である。

2 mM Cu^{2+} や Hg^{2+} により完全に阻害されるが, Fe^{2+} , Fe^{3+} には影響されない。又, 100mM NaCl, 10mM KF, KH_2PO_4 にも阻害されない。

蛇毒ホスホリパーゼ A_2 の特異的修飾試薬パラプロモフェナシルプロミドによりモノマー当り His 1 残基が修飾されて失活するとともに溶血活性も失う。2—ニトロフェニルスルフェニクロリドによりモノマー当り 1 残基存在する Trp が修飾され大部分の酵素活性を失なう。しかしチオール酵素の阻害剤パラクロロメリクリ安息香酸やセリン酵素の阻害剤フェニルメタンサルホニルフルオリドには全く阻害されない。

3) 溶 血

本酵素は単独で弱い溶血活性を持つ。溶血にはリゾホスホリパーゼ活性が必要で, Ca^{2+} 非存在下, もしくは化学修飾により酵素活性を失なったリゾホスホリパーゼ I には溶血活性は無い。

本酵素をそれ自身溶血活性を持たないホスホリパーゼ A_2 と共存させると強い溶血活性を回復する。粗毒における強い溶血活性は本酵素とホスホリパーゼ A_2 との共同作用であった。どちらか一方の酵素で赤血球を前処理しても溶血量に変化は無く, 両者が共存することが重要である。又どちらか一方の酵素を化学修飾により失活させると溶血も殆ど認められなくなる。

4) 考 察

現在まで知られているリゾホスホリパーゼ及びホスホリパーゼ B はいずれもチオール酵素又はセリン酵素であるのに対し, 本酵素はこれらの修飾試薬の影響を受けず, 逆に蛇毒ホスホリパーゼ A_2 の特異的修飾試薬パラプロモフェナシルプロミドにより修飾を受け失活する。その他のタンパク化学的性質, 酵素化学的性質も本酵素はこれらとは全く異なっており, リゾホスホリパーゼとしては新しい型の酵素である。

本酵素は分子量, アミノ酸組成, アミノ末端部のアミノ酸配列等のタンパク化学的性質, 至適 pH, Ca^{2+} 要求性, 熱安定性, パラプロモフェナシルプロミドで His が修飾されて失活すること, その他の化学修飾試薬や阻害剤の影響等, 基質特異性を除く酵素化学的性質がいずれも

蛇毒ホスホリパーゼ A₂ と一致することからこれらと類似の構造をしていると考えられる。しかしホスホリパーゼ A₂ の基質であるホスファチジルコリンには作用しないでその生成物であるリゾホスファチジルコリンの 1 位のエステルを加水分解する点が大きな違いで、この違いを生み出す立体構造上の違いの解明が待たれる。

本酵素はそれ自身、弱い溶血活性を持つがホスホリパーゼ A₂ が共存すると溶血は著しく促進される。粗毒における強い溶血活性は本酵素とホスホリパーゼ A₂ との共同作用であった。

溶血の機構はハチ毒やコブラ毒が陽イオン性界面活性剤様効果によるものであるのに対し *Pseudechis australis* の場合は酵素作用が重要な働きをしている。

以 上

表— 1 リゾホスホリパーゼの精製

画 分	全タンパク 量 (mg)	リゾホスホリパーゼ活性 全活性 (units)	回収率 (%)	比活性 (units/mg)	精製 (倍)	溶血活性 (hemolytic units)
乾 燥 毒 液	600	709	100	1.18	1	21,000
CM-52, pH6.4 (非吸着部分)	145	658	93	4.45	3.8	18,000
CM-52, pH5.9 (Fr- I)	35.1	534	75	15.2	13	11,000
Sephadex G-75 (S- II)	8.40	470	66	56.0	47	630
DE-52						
リゾホスホリパーゼ I	3.96	230	32	58.1	49	80
リゾホスホリパーゼ II	1.74	108	15	62.1	53	N. D.*

*測定しなかった。

論文審査の結果の要旨

高崎親久提出の論文はオーストラリア産溝牙科ヘビ *Psendechis australis* (通称キングブラウンスネーク)の毒液からリゾホスホリパーゼを精製・単離し、その性質を明らかにしたものである。

リゾホスホリパーゼはリゾレシチン等、リゾ体の磷脂質を加水分解する酵素である。この酵素は生体に比較的広く分布するが、単離されたものは少く、分子量その他の性質も酵素源により、また著者によりまちまちであった。

高崎はキングブラウンスネークの毒液から、カラムクロマトグラフィー等をくり返し用いることにより、ホスホリピドには全く作用せず、リゾ体のみに特異的に作用するリゾホスホリパーゼを精製・単離し、その諸性質を明らかにした。すなわちこの酵素は分子量、アミノ酸組成、アミノ末端附近のアミノ酸配列をはじめ、至適水素イオン濃度、耐熱性、カルシウムイオン要求、ヒスチジンの修飾による失活等多くの点で通常ホスホリパーゼ A₂ によく似ている。しかしその特異性はホスホリパーゼとは全く異り、リゾレシチン等のリゾ体だけにのみ作用するのである。構造的によく類似した酵素が、このようにはっきりと特異性の面で異なるのは興味深い。

この酵素は単独では溶血活性は弱いですが、ホスホリパーゼ A₂ と共存すると強い溶血活性を示す。原毒液の強い溶血活性は従ってリゾホスホリパーゼ、ホスホリパーゼ A₂ の共同作用として理解することができ、これもこの酵素の生理的役割りを示唆して興味深い。

以上高崎親久提出の論文は、蛇毒中にリゾホスホリパーゼを発見、単離し、その性質を明らかにし、リゾホスホリパーゼの構造、生理的意義につき重要な新知見を得たもので、高崎親久が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって高崎親久提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。